

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2001-502553

(P2001-502553A)

(43)公表日 平成13年2月27日 (2001.2.27)

| (51)Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テーマコード [*] (参考) |
|--------------------------|-------|---------------|--------------------------|
| C 12 N 15/09 | Z N A | C 12 N 15/00 | Z N A A |
| A 61 K 31/711 | | A 61 K 31/711 | |
| 35/00 | | 35/00 | |
| 39/395 | | 39/395 | N |
| 48/00 | | 48/00 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 44 頁) 最終頁に統く

| | |
|--------------|-------------------------|
| (21)出願番号 | 特願平10-520119 |
| (86) (22)出願日 | 平成9年10月27日 (1997.10.27) |
| (85)翻訳文提出日 | 平成11年4月9日 (1999.4.9) |
| (86)国際出願番号 | PCT/FR97/01921 |
| (87)国際公開番号 | WO98/18825 |
| (87)国際公開日 | 平成10年5月7日 (1998.5.7) |
| (31)優先権主張番号 | 96/13176 |
| (32)優先日 | 平成8年10月29日 (1996.10.29) |
| (33)優先権主張国 | フランス (FR) |

| | |
|---------|---|
| (71)出願人 | ローヌーブーラン・ロレ・エス・アーフ フランス国、エフー92160・アントニー、 アブニユ・レイモン・アロン、20、ディレ クシオン・ブルベ |
| (72)発明者 | ブラコ、ロラン フランス国、エフー75013・パリ、リュ・ ムラン・デ・ブレ、12 |
| (72)発明者 | ドビュッシユ、ロラン フランス国、エフー91200・アテイス・モ ンス、アブニユ・ジヤン・ジョレス、112 |
| (74)代理人 | 弁理士 川口 義雄 (外2名) |

最終頁に統く

(54)【発明の名称】 抗p53一本鎖抗体フラグメント及びその使用

(57)【要約】

本発明は、腫瘍細胞で発現させることができ、in vitro DNA結合機能とin vivo 転写活性化機能を復元することができる抗p53タンパク質一本鎖抗体に関する。本発明はこれらの分子をコードする核酸、該核酸を含むベクター及びそれらの使用にも関する。

【特許請求の範囲】

1. 突然変異 p 5 3 タンパク質をもつ細胞に p 5 3 依存性トランス活性化活性を復元する方法であって、突然変異 p 5 3 タンパク質に特異的に結合することが可能な一本鎖抗体を前記細胞に導入することを特徴とする前記方法。
2. 前記細胞で機能的なプロモーターの制御下に前記一本鎖抗体をコードする配列を含む核酸を前記細胞に導入することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。
3. 一本鎖抗体がオリゴマー化ドメインと調節ドメインをもつ p 5 3 の C 末端領域に存在するエピトープに特異的に結合可能であることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の方法。
4. 一本鎖抗体が残基 320～393 に含まれる p 5 3 の C 末端領域に存在するエピトープに特異的に結合可能であることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。
5. 一本鎖抗体が配列番号 1 の S c F v 4 2 1 及び配列番号 2 の 1 1 D 3 から選択されることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。
6. 核酸がベクターの一部を構成することを特徴とする請求項 2 に記載の方法。
7. ベクターがウイルスベクターであることを特徴とする請求項 6 に記載の方法。
8. ベクターが欠損組換えアデノウイルスであることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。
9. ベクターが欠損組換えレトロウイルスであることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。
10. ベクターが欠損組換え A A V であることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。
11. ベクターが欠損組換え H S V であることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。
12. ベクターが化学又は生化学ベクターであることを特徴とする請求項 6 に記載の方法。
13. 突然変異 p 5 3 タンパク質が腫瘍抑制活性を欠失していることを特徴とす

る請求項 1 又は 2 に記載の方法。

14. 突然変異 p 5 3 タンパク質が腫瘍細胞中に存在する形態であることを特徴とする請求項 1 3 に記載の方法。

15. 突然変異 p 5 3 タンパク質が p 5 3 H 2 7 3、p 5 3 W 2 4 8 及び p 5 3 G 2 8 1 タンパク質から選択されることを特

徴とする請求項 1 4 に記載の方法。

16. 突然変異 p 5 3 タンパク質をもつ細胞が腫瘍細胞であることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の方法。

17. 腫瘍細胞が肺、結腸、頭蓋及び頸、肝臓、脳の腫瘍の細胞であることを特徴とする請求項 1 6 に記載の方法。

18. 突然変異 p 5 3 タンパク質のコンホメーションを改変するための、突然変異 p 5 3 タンパク質に特異的に結合することが可能な一本鎖抗体の使用。

19. 突然変異 p 5 3 タンパク質が関与する過剰増殖疾患の治療用医薬組成物の製造のための、突然変異 p 5 3 タンパク質に特異的に結合することが可能な一本鎖抗体の使用。

20. 突然変異 p 5 3 タンパク質が関与する過剰増殖疾患の治療用医薬組成物の製造のための、突然変異 p 5 3 タンパク質に特異的に結合することが可能な一本鎖抗体をコードする核酸の使用。

21. 1 1 D 3 分子又は同一エピトープを認識するかもしくは改善された親和性をもつ変異体。

22. 請求項 2 1 に記載の分子をコードする核酸。

23. cDNA、RNA、合成核酸又は半合成核酸であること

を特徴とする請求項 2 2 に記載の核酸。

24. 配列番号 2 の配列をもつことを特徴とする請求項 2 3 に記載の核酸。

25. 請求項 2 2 に記載の核酸を含む組成物。

26. 請求項 2 1 に記載の分子を含む組成物。

27. 請求項 2 2 に記載の核酸と医薬的に許容可能なキャリヤーを含む過剰増殖

疾患の治療用医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

抗p53一本鎖抗体フラグメント及びその使用

本発明は転写因子機能が欠失又は低下した突然変異p53タンパク質をもつ細胞にp53依存性トランス活性化活性を復元するための方法に関する。より詳細には、本発明の方法は突然変異p53タンパク質に特定的に結合することが可能な一本鎖抗体の使用にある。本発明は更に、p53タンパク質に特定的且つ有効に結合することができ、更に腫瘍細胞にp53活性を復元することができる新規分子と、これらの分子をコードする核酸及び該核酸を含むベクターにも関する。本発明の方法及び分子はp53及びその突然変異形態の作用メカニズムを調査するため又はp53タンパク質を精製するためにin vitro又はex vivoで使用可能である。特に癌等の疾病的関連で特にp53活性を復元する治療アプローチでin vivo使用することもできる。

野生型p53タンパク質は細胞周期の調節と細胞のゲノムの完全性の維持に関与している。このタンパク質は所定の遺伝子の転写アクチベーターであることを主機能とし、ゲノムの複製

中に突然変異が出現すると、細胞周期のG1期の細胞を阻止し、所定数のDNA修復プロセスを開始することができるが、そのプロセスはまだ十分に解明されていない。更に、これらの修復プロセスが機能不良の場合又は突然変異現象の発生頻度が高過ぎて修復できない場合には、このタンパク質はアポトーシスと呼ばれるプログラムされた細胞死現象を誘導することができる。このように、p53タンパク質は異常に分化した細胞又はゲノムが損傷した細胞を除去することにより腫瘍抑制剤として作用する。

p53のこの主機能はその転写因子機能に依存し、換言するならば、ゲノムDNAのレベルで特異的配列を認識すると共に、一般転写機構を強化するという二重の機能に依存する。

p53タンパク質は以下の5個の機能ドメインを規定する393個のアミノ酸を含む。

—TBPタンパク質等の所定の一般転写機構因子と結合することができるアミ

ノ酸1～73から構成される転写活性化ドメイン。このドメインは所定数の翻訳後修飾の場である。また、野生型タンパク質の機能を阻止することが可能な多数の他のタンパク質、特に細胞タンパク質m dm 2又はエプスタイン・バ

ーウイルス(EBV)のEBNA5タンパク質とp53タンパク質との多数の相互作用の場である。更に、このドメインはタンパク分解を受け易いPESTと呼ばれるアミノ酸配列をもつ。

—アミノ酸73～315に局在するDNA結合ドメイン。p53のこの中心ドメインのコンホメーションはp53タンパク質の特異的DNA配列の認識を調節する。このドメインは野生型タンパク質の機能に作用する以下の2種の変異の場である。

(i) SV40ウイルスの「ラージT」抗原又はユビキチン系によりその分解を生じることが可能なHPV16及びHPV18ウイルスのE6ウイルスタンパク質のようにp53の機能を阻止するタンパク質との相互作用。後者の相互作用は細胞タンパク質E6ap(ユビキチン化カスケードのE3酵素)の存在下でしか生じることができない。

(ii) p53の機能に作用し、ほぼ全体がこの領域に局在する点突然変異。—主機能を実施する区画にタンパク質を良好に送達するのに不可欠なアミノ酸315～325から構成される核局在化シグナル。

—アミノ酸325～355から構成されるオリゴマー化ドメイン。この325～355領域はβシート(326～334)－湾曲部(335～336)－αヘリックス(337～355)の型の構造を形成する。この領域に局在する機能変異は野生型タンパク質の機能を種々に変更し得る種々の突然変異形態と野生型タンパク質の相互作用に主に起因する。

—p53タンパク質の機能を正又は負に調節する所定数の翻訳後修飾(グルコシル化、リン酸化、RNA固定等)の場であるアミノ酸365～393から構成される調節ドメイン。このドメインは野生型タンパク質の活性の調節に極めて重要な役割を果たす。

p 5 3 タンパク質の機能は種々の方法で妨害され得る。

－例えばS V 4 0 ウイルスの「ラージT」抗原、エプスタイン・バーウイルスのE B N A 5 タンパク質又は細胞タンパク質m d m 2 等の所定数の因子による機能阻止。

－特にp 5 3 がユピキチン化周期に入るのを助長するヒトパピローマウイルスH P V 1 6 及びH P V 1 8 のE 6 タンパク質との相互作用によるタンパク分解感受性の増加によるタンパク質の脱安定化。この場合、これらの2種のタンパク質の相互作

用は細胞タンパク質が予め固定されていないと生じないが、E 6 a p タンパク質の固定部位はよくわかつていない。

－p 5 3 の遺伝子のレベルの点突然変異。

－p 5 3 の1又は2個の対立遺伝子の欠失。

後者2種の変異は種々の癌の約50%で認められる。この点については、癌細胞で記録されているp 5 3 の遺伝子の突然変異はこのタンパク質をコードする遺伝子の非常に大部分に及んでおり、その結果、このタンパク質の機能に種々の変異を生じている。但し、これらの突然変異は大半がp 5 3 タンパク質の中心部分に局在しており、この部分はp 5 3 タンパク質の特異的ゲノム配列との接触領域であることが知られている。p 5 3 タンパク質の突然変異体の大半が野生型タンパク質を認識するD N A配列に固定できず、従って、転写因子の役割を發揮できないという主特徴をもつのはこのためである。更に、突然変異体のうちには転写レベルで所定の遺伝子の活性化等の新規機能を獲得しているものもあるらしい。

現在、これらの変異は3種に分類されている。

－所謂弱変異体。この突然変異体の産物は非機能的タンパク質であり、2個の対立遺伝子のうちの1個だけが突然変異して

いる場合には、他方の対立遺伝子によりコードされる野生型タンパク質の機能は変わらない。この分類の代表例は突然変異体H 2 7 3 及びW 2 4 8 であり、後者は癌性疾患過敏家族性L i - F r a u m e n i 症候群に特異的である。

– 優性ネガティブ変異体。この突然変異体の産物は非機能的タンパク質であり、2個の対立遺伝子のうちの1個のみが突然変異している場合には、野生型タンパク質との相互作用により、野生型タンパク質の特異的DNA配列にもはや結合できない非活性混合オリゴマーを形成し、野生型タンパク質の機能を阻止することができる。

– 優性癌突然変異体。この突然変異体の産物は、2番目の分類の突然変異体と同様に野生型タンパク質の機能を阻止すると共に、よくわかつていないメカニズムにより腫瘍発生を助長し、機能獲得することが可能なタンパク質である。この分類の代表例は突然変異体H175である。

野生型p53遺伝子は、抗腫瘍性とアポトーシス性をもち、多数の過剰増殖型疾患に関与しているため、遺伝子及び細胞治療のアプローチで使用されている。特に、野生型p53遺伝子のin vivo投与、p53の機能の復元により所定の過剰

増殖疾患、特に癌を治療することが提案されている。投与はウイルスベクター、特にアデノウイルス(WO94/24297)又はレトロウイルス(WO94/06910)により実施することが好ましい。例えば野生型p53タンパク質をコードする核酸を導入すると、細胞増殖の正常調節を部分的に復元できることが報告されている(Rothら, Nature Medicine 2 (1996) 985)。p53型の性質をもつ化学分子の使用に基づく代替ストラテジーも開発されている(PCT/FR96/01111)。

野生型表現型即ち野生型p53の腫瘍抑制性とアポトーシス性をもつように内因性突然変異タンパク質を復帰突然変異させることより、野生型p53タンパク質の機能を復元するアプローチもある。このアプローチは、p53の突然変異体の機能喪失が突然変異により誘導されるタンパク質のコンホーメーション変化に起因するという知見に基づく。この点で、WO94/12202はp53タンパク質に対する特定モノクローナル抗体pAb421がヒト癌に頻出するある種の突然変異体にDNA結合機能をin vitroで復元できることを示している。しかし、この種の化合物を使用すると、多量の抗体が必要であ

り（従って、付随する製造／精製の問題）、細胞内に侵入しにくいため、重大な欠点がある。

本願は p 5 3 タンパク質の突然変異体に野生型性質を復元するための高性能アプローチに関する。本願は特に、野生型 p 5 3 機能の復元という有利な性質をもつ p 5 3 タンパク質に特に特異的なリガンドの構築に関する。より詳細には、本願は p 5 3 タンパク質の特異的一本鎖抗体 (S c F v) 、特に 1 1 D 3 分子の構築に関する。本願は更に、S c F v が p 5 3 を認識することができ、腫瘍細胞中で有効に発現でき、p 5 3 のある種の突然変異体のトランス活性化機能の一部を再活性化できることを実証する。

従来技術の方法に比較して、この分子は重要な利点があり、特に腫瘍細胞中で多量に in situ 発現できる。従来の抗体と S c F v の間には親和性がないことが多かったため、上記結果は予想外である。更に、本願出願人は最適生物活性を得られるように適当な細胞内区画で S c F v を発現できることを実証した。

従って、本発明の第 1 の目的は、突然変異 p 5 3 タンパク質をもつ細胞に p 5 3 依存性トランス活性化活性を復元する方法

にあり、突然変異体 p 5 3 タンパク質に特異的に結合することが可能な一本鎖抗体を細胞に導入することを特徴とする。有利な態様によると、本発明の方法は細胞で機能的なプロモーターの制御下に前記一本鎖抗体をコードする配列を含む核酸を細胞に導入する。本発明の別の側面は、タンパク質のコンホメーションを改変するための、突然変異 p 5 3 タンパク質に特異的に結合することが可能な一本鎖抗体の使用に関する。本発明は更に、突然変異 p 5 3 タンパク質が関与する過剰増殖疾患の治療用医薬組成物を製造するための、突然変異 p 5 3 タンパク質に特異的に結合することが可能な一本鎖抗体の使用と、突然変異 p 5 3 タンパク質が関与する過剰増殖疾患の治療用医薬組成物を製造するための、突然変異 p 5 3 タンパク質に特異的に結合することが可能な一本鎖抗体をコードする核酸の使用にも関する。

従って、本発明の方法の一面は突然変異 p 5 3 抗体に特異的に結合することが可能な一本鎖抗体の構築、ベクタークローニング及び細胞導入にある。一本鎖抗

体 (S c F v) はアームにより VL 領域に結合した VH 領域から主に構成される。S c F v とこのような改変抗体をコードする核酸配列の構築は例えば

参考資料として本明細書の一部とする米国特許第4, 946, 778号又はWO 94/02610、WO 94/29446に記載されている。

本願はより詳細には、p 53に対する抗体を產生するハイブリドーマバンクの作製と、このバンクからの対応 S c F v の構築に関する。本願は対応核酸の発現ベクタークローニングとその細胞導入にも関する。本願は、この導入により p 53 の突然変異体のDNA結合活性及びそのトランス活性化活性を有効に in vivo で復元できることも実証する。

より詳細には、本発明の方法はオリゴマー化ドメインと調節ドメインをもつ p 53 の C 末端領域に存在するエピトープに特異的に結合することが可能な S c F v を利用する。この点で、本願はELISA法によりこの性質をもつ S c F v を選択する試験にも関する。

更に詳細には、本発明の方法で使用する S c F v は残基 320 ~ 393 に含まれる p 53 の C 末端領域に存在するエピトープに特異的に結合することができる。この点で、本願は特定例として配列番号 1 の S c F v 421 及び配列番号 2 の 11D3 の S c F v の構築及び発現に関する。

本発明の方法は、DNAに結合する能力を完全又は部分的に失った突然変異 p 53 タンパク質に一般に適用可能であり、本発明の方法はこの機能を復元することができる。より詳細には、本発明の方法は p 53 転写因子機能を完全又は部分的に失った突然変異 p 53 タンパク質に適用可能であり、この機能を復元することができる。復元レベルは完全でも部分的でもよい。有利な態様によると、突然変異体が細胞周期の阻止及び/又はアボトーシス誘導により腫瘍抑制機能を發揮できるために十分なレベルまで復元する。従って、本発明の方法は腫瘍抑制活性を欠失する内因性突然変異 p 53 タンパク質をもつ細胞にこの活性を少なくとも部分的に復元することができる。有利な態様によると、腫瘍細胞に存在する突然変異タンパク質に作用する。上述のように、p 53 タンパク質の種々の突然変異

形態が腫瘍細胞で報告されている。例えば、p53H273、p53W248及びp53G281タンパク質を挙げることができる。下記実施例では特に、本発明の方法がこれらの突然変異体のコンホメーション及び生物学的性質を *in vitro* 及び *in vivo* で改変できることを立証する。特に、これらの実施例は ScFv421 及び 11D3 が DNA に特異的に結合して p

53 依存性トランス活性化を誘導する機能を 273 及び 248 突然変異体に復元できることを立証する。

本発明の方法は *in vitro*、*ex vivo* 又は *in vivo* のいずれでも使用することができる。 *in vitro* 又は *ex vivo* では本発明の方法及び分子は例えば p53 の作用メカニズムとその突然変異形態を調査することができる。更に、本発明の分子は例えば支持体と結合し、p53タンパク質を含む溶液と接触させた後、形成された複合体を検出又は溶離することにより、p53タンパク質の検出又は精製に使用することができる。 *in vivo* では、特にヒトの場合、p53活性の欠失が認められる過剰増殖疾患等の疾病でこの機能を復元することができる。この点で、本発明は上記アプローチ（野生型 p53 遺伝子の導入）又は化学療法（WO 96/22101）と併用することができる。更に *in vivo* では、本発明の方法及び分子は、例えば ScFv の発現レベルを測定し、ヒト治療アプローチの可能性を評価するために、動物で使用可能である。

有利な態様によると、突然変異 p53タンパク質をもつ細胞は哺乳動物腫瘍細胞である。この点では、より詳細には（特に

小細胞をもたない）肺癌、結腸癌、肝臓癌、脳、頭蓋及び頸癌、より一般的には p53タンパク質の突然変異形態が観察される任意癌の細胞を挙げることができる。有利な態様によると、突然変異体 p53H273、P53W248 及び／又は p53G281 が観察されるヒト腫瘍細胞（肺、結腸、脳、頭蓋及び頸、肝臓）が挙げられる。本発明の方法を特定細胞に適用できるか否かは以下の方法により容易に決定できる。まず細胞に突然変異 p53タンパク質が存在するか否かを

調べる。次に、このタンパク質の突然変異の種類を調べる。公知突然変異、特に上記突然変異であるならば、細胞は本発明の方法により処理可能であるとみなすことができる。上記以外の突然変異の場合には別のアプローチが考えられる。まず突然変異タンパク質を単離（又は人工的に合成）し、実施例に記載するように S c F v の存在下でその *in vitro* 及び *in vivo* 構造を試験する。こうすると、このタンパク質の欠失機能を復元するのに適した S c F v を決定することができる。別のアプローチとして、細胞培養物で S c F v を直接試験し、S c F v の生物学的効果を決定することもできる。

本発明の方法を利用するためには、細胞で機能的なプロモー

ターの制御下に S c F v をコードする核酸をもつベクターの形態で S c F v を細胞に *in vitro*、*ex vivo* 又は *in vivo* 導入すると有利である。

プロモーターは哺乳動物、好ましくはヒト細胞で機能的なプロモーターから選択すると有利である。過剰増殖（癌、再発狭窄症等）細胞で核酸の発現を可能にするプロモーターがより好ましい。この点では種々のプロモーターを使用することができる。例えば p 5 3 遺伝子の固有プロモーターを挙げることができる。（合成タンパク質も含めた他のタンパク質の発現に関与する）別の起源の領域でもよい。従って、ある遺伝子の転写を特異的又は非特異的、誘導的又は非誘導的に強く又は弱く刺激又は抑制する任意プロモーター又は誘導配列を挙げることができる。特に、真核又はウイルス遺伝子のプロモーター配列を挙げることができる。例えば、標的細胞のゲノムに由来するプロモーター配列を挙げることができる。真核プロモーターのうちでは、特に、ユビキチンプロモーター（H P R T、P G K、 α -アクチン、チューブリン等の遺伝子のプロモーター）、中間フィラメントのプロモーター（G F A P、デスミン、ビメンチン、ニューロフィラメント、ケラチン等の遺伝子のプロモータ

ー）、治療遺伝子のプロモーター（例えば M D R、C F T R、V I I I 因子、A p o A I 等の遺伝子のプロモーター）、組織特異的プロモーター（ピルビン酸

キナーゼ、ビリン、脂肪酸結合タンパク質、平滑筋細胞の α アクチン等の遺伝子のプロモーター) 又は刺激応答プロモーター (ステロイドホルモンレセプター、レチノイン酸レセプター等) を使用することができる。あるいは、ウイルスのゲノムに由来するプロモーター配列 (例えばアデノウイルスのE1A及びMLP遺伝子のプロモーター、CMVの初期プロモーター又はRSVのLTRのプロモーター等) でもよい。更に、活性化配列、調節配列又は組織特異的発現もしくは最大発現を可能にする配列を付加してこれらのプロモーター領域を修飾してもよい。

上述のように、本願は特に有利な突然変異p53タンパク質の結合及び復帰突然変異性をもつ新規分子にも関する。本発明はより詳細には、特定S_cF_v(11D3、421)の構築、ベクタークローニング及び細胞導入に関する。これらのS_cF_vの核酸及びペプチド配列を配列表1及び2に示す。後記実施例では、
(i) C末端領域で突然変異p53タンパク質に特異的に結合することができ、
(ii) これらの突然変異タンパク

質にDNA結合能を与え、(iii) これらのタンパク質に転写活性化能を与えるというこれらの分子の特に有利な機能を立証する。更に実施例では、これらの分子が腫瘍細胞で適正に発現され、過剰増殖疾患に有利に利用できることも立証する。また、本発明のS_cF_vの性質を更に改善することもできる。特に、S_cF_vの親和性はCDR領域(配列に下線で示す)によって変化し、突然変異誘発／選択の日常実験により改善できることが知られている。因に、抗体の突然変異誘発は例えばMarksら(Bio/Technology, 10, 779-783, 1992)及びWinter G.とMilstein C. (Nature, 349, 293-299, 1991)により記載されている。これらの文献に記載されている技術を利用し、本発明により改変した親和性をもつS_cF_vの変異体を作製することができる。その後、実施例に記載する条件で選択することができる。

従って、本発明は配列番号2のペプチド配列をもつ11D3分子と、p53タンパク質に結合する能力を保存しながらCDR領域に変異をもつ任意変異体にも

関する。変異はCDR領域の1個以上の残基の欠失、置換又は挿入のいずれでもよい。変

異は10個未満の残基とすると有利である。

本発明はScFv11D3をコードする任意核酸又は上記変異体にも関する。

本発明の核酸はリボ核酸(RNA)でもデオキシリボ核酸(DNA)でもよい。相補的DNA(cDNA)が有利である。ヒト、動物、ウイルス、合成又は半合成のいずれの起源のものでもよい。核酸は種々の方法で得られ、特に、本明細書に示す配列と例えば核酸合成器を使用することにより化学的合成により得られる。特に本明細書に記載するような特異的プローブを使用してバンクスクリーニングにより得ることもできる。バンクからスクリーニングした配列を化学的に修飾(伸長、欠失、置換等)する混合法でも得られる。一般に、本発明の核酸は当業者に公知の任意方法により製造することができる(特に参考資料として本明細書の一部とする米国特許第4,946,778号及びWO94/02610に記載の技術参照)。ScFvをコードする核酸の慣用構築ストラテジーは以下の通りである。選択した抗p53抗体を産生するハイブリドーマからVH及びVL領域をコードするcDNAを獲得する。このためには、ハイブリドーマの全RNAを抽出し、プライマーとしてランダム

ヘキサマーを使用することにより逆転写反応を行う。この種のプライマーを使用すると、免疫グロブリンの特異的プライマーを使用せずに済む。得られたcDNAのクローンはV領域をクローニングするために十分な長さをもつ。クローンの寸法が存在する全cDNAの非常に小さいフラクションにしか相当しない場合には、予備增幅反応を実施し、クローニングに十分なDNAを作製することができる。このためには、VH及びVL領域をコードするcDNAを夫々別個に增幅する。使用するプライマーは各鎖(H及びL)の可変領域の両端のレベルにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドである。次に、H鎖の特異的プライマーを使用する増幅産物と、L鎖の特異的プライマーを使用する増幅産物を精製する。精製後、抗体のVH及びVL領域をコードするcDNAをヌクレオチドアーム(L)

により結合し、単一鎖とする。ヌクレオチドアームは一方の末端がVH領域をコードするcDNAの3'末端に結合し、他方がVL領域をコードするcDNAの5'末端に結合するように構築しておく。アームの配列はペプチド(G4S)3をコードする。結合後の配列は約700bpであり、例えば配列番号1及び2に示す配列をもつVH-L-VL鎖をNcoI-NotIフラグ

メントとして含む。

好ましくは、本発明の核酸はcDNA又はRNAである。

本発明の核酸は、

(a) 配列番号2の配列の全部もしくは一部又はその相補鎖、
 (b) 配列(a)とハイブリダイズし、好ましくはC末端領域のレベルでp53タンパク質に特異的に結合することが可能なScFvをコードする任意配列、
 (c) 遺伝コードの縮重による(a)及び(b)の変異体から選択すると有利である。

本発明は更に、上記核酸と、その発現を可能にするプロモーターと、転写終結シグナルを含む任意発現カセットにも関する。

本発明の方法では、(i)細胞侵入効率、(ii)ターゲティング及び/又は(iii)細胞外及び細胞内安定性を改善することが可能な投与ベクターにより核酸を細胞に導入すると有利である。

本発明の特に好ましい実施態様では、化学的起源(リポソーム、ナノ粒子、ペプチド複合体、カチオン脂質又はポリマー等)、ウイルス起源(レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、AAV、ワクチンウイルス等)又はプラスミド起源の

いずれでもよいベクターに核酸を組み込む。

ウイルスベクターの使用はウイルスの天然トランスフェクション性を利用するものである。従って、例えばアデノウイルス、ヘルペスウイルス、レトロウイルス及びアデノ随伴ウイルスを使用することができる。これらのベクターはトランスフェクション面で特に高性能であることがわかっている。特に、アデノウイル

スとレトロウイルスは腫瘍細胞感染能をもつため、本発明の範囲で選択されるベクターである。この点では、本発明の好ましい実施態様では、レトロウイルスベクター即ち上記のような S c F v をコードする核酸を含むゲノムをもつ欠損組換えレトロウイルスの形態で核酸を導入する。本発明の別の好ましい実施態様では、アデノウイルスベクター即ち上記のような S c F v をコードする核酸を含むゲノムをもつ欠損組換えアデノウイルスの形態で核酸を導入する。

本発明のベクターは核酸の真核細胞導入及び発現を助長することが可能な非ウイルス剤でもよい。天然又は合成の化学又は生化学ベクターは特に便利で安全であり、トランスフェクトしようとするDNAの寸法に関して理論的制限がないため、天然ウイルスに代わる有利な代用品である。これらの合成ベクター

はトランスフェクトしようとする核酸を圧縮し、細胞固定とその形質膜及び場合により 2 つの核膜の通過を助長するという 2 つの主機能をもつ。核酸のポリアニオン性を緩和するために、非ウイルスベクターは全ポリカチオン電荷をもつ。本発明の特定方法では、ベクターは化学又は生化学ベクターである。

本発明は更に少なくとも 1 種の上記核酸を含む任意組成物にも関する。

本発明は更に、少なくとも 1 種の上記ベクターを含む任意組成物にも関する。

本発明は更に、少なくとも 1 種の上記 S c F v を含む任意組成物にも関する。

本発明は更に、同時又は別時点で併用するために、上記核酸又はベクターと、野生型 p 5 3 をコードする核酸又はベクターを含む組成物にも関する。

本発明の医薬組成物は、抗増殖性により、特に癌や再発狭窄症等の過剰増殖疾患の治療に特に適している。従って、本発明は細胞、特に過剰増殖細胞の破壊に特に有効な方法を提供する。

本発明は in vitro 又は ex vivo で使用することができる。この場合には、1 種以上の核酸（又はベクター又

はカセット又は直接 S c F v の存在下に細胞をインキュベートすることから主に構成される。細胞 1 0 6 個当たりベクター 0.01 ~ 1 0 0 0 μ g 用量又はウイルスベクター 1 個当たり 0.1 ~ 1 0 0 0 M O I を使用することができる。

in vivoでは、有効量の本発明のベクター（又はカセット）を好ましくは治療部位（特に腫瘍）のレベルで直接生物に投与する。この点で、本発明は過剰増殖細胞又はその一部を上記核酸と接触させることを特徴とする、過剰増殖細胞の破壊方法にも関する。in vivo使用のために本発明で使用される核酸又はベクターは局所、経口、非経口、鼻腔内、静脈内、筋肉内、皮下、眼内、経皮等の経路で投与するように調剤することができる。注射可能な形態で核酸又はベクターを使用するのが好ましい。従って、特に治療部位のレベルに直接注射することを目的とした注射用製剤に医薬的に許容可能な任意のキャリヤーに混合することができる。キャリヤーとしては特に、滅菌等張溶液又は場合に応じて滅菌水もしくは生理的血清を加えて注射可能な溶質を構成し得る乾燥（特に凍結乾燥）組成物が挙げられる。患者の腫瘍に核酸を直接注入すると、患部組織のレベルに治療効果を集中させることができるので有利である。

核酸の使用量は種々のパラメーター、特に使用する遺伝子、ベクター、投与方法、該当疾病又は必要な治療期間に応じて適応できる。in vivo投与量はアデノウイルス等のベクターでは106～1010pfuとすると有利である。また、反復投与も考えられる。

更にin vivoで本発明の方法及び分子を使用し、p53の作用メカニズムを調査し、動物モデルでSCFVの力価を測定することができる。

本発明は過剰増殖（即ち異常増殖）細胞の破壊にin vivo使用すると有利である。本発明は腫瘍細胞又は血管壁の平滑筋細胞（再発狭窄症）の破壊にも適用できる。本発明は、p53の突然変異体が観察される癌の治療に特に適している。このような癌としては、例えば結腸アデノ癌、甲状腺癌、肺上皮腫、骨髄性白血病、結腸直腸癌、乳癌、肺癌、胃癌、食道癌、Bリンパ腫、卵巣癌、膀胱癌、神経膠芽腫、肝癌、骨癌、皮膚癌、脾臓癌、腎臓癌、前立腺癌、食道癌、喉頭癌、頭蓋及び頸癌、HPV陽性生殖器癌、EBV陽性上咽喉癌、細胞タンパク質mdm2が過剰発現される癌等を挙げることができる。

以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、これら

の実施例は単なる例示であり、発明を制限するものではない。

図面の説明

図1：抗体のスクリーニングストラテジー。

図2：p53のゲルに遅延を誘導する抗体の能力の試験結果。

図3：p53H273のゲルに遅延を誘導する抗体の能力の試験結果。

図4：ScFvと野生型p53の結合のELISA試験結果。

●：IgG 11D3（出発時1μg/ml）；○：IgG421（出発時1μg/ml）；□：ビオチン化ポリクローナル血清（出発時1μg/ml）；▲：ScFv111D3-myc（出発時1/2）；△：ScFv421-myc（出発時1/2）；◇：非該当ScFv（抗CD3、出発時1/2）。

図5：ScFvにより誘導されるゲル上の遅延の試験結果。

図6：p53の突然変異体のDNA結合活性の復元。

図7：H1299細胞におけるScFv421の発現。

図8：H358系における突然変異体H273の転写活性の復元。

図9：HT29系における内因性突然変異体H273の転写活性の復元。

実施例

実施例1：抗体11D3の獲得及びスクリーニング

本実施例はp53の突然変異形態のDNA結合機能を活性化することが可能なp53タンパク質の特異的モノクローナル抗体の作製、獲得及び選択に関する。

1. 1. マウス免疫時に使用したタンパク質の獲得及びハイブリドーマのスクリーニング

組換えバキュロウイルスを感染させた昆虫細胞Spodoptera frugiperda Sf9で野生型p53タンパク質及び腫瘍細胞に頻出する野生型p53の突然変異に対応する種々のタンパク質p53H273、p53W248、p53G281を生産し、ポリクローナル抗体PAb421を結合したアガロースゲルでアフィニティ精製した(Leveillard, EMBO J. 15, 1615-1623 (1996))。Invitrogen社の指示に従い、組換えバキュロウイルスを感染させた昆虫細胞Spodoptera fr

ugiperda Sf9で野生型p53タンパク質のフラグメント1～320及び73～320に対応するタンパク質も生産した。例えばSambrookら(Sambrook, Fritsch

& Maniatis: Molecular cloning, a laboratory manual, 第2版, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory)に記載されているような慣用組換えDNA技術により、導入用プラスミドpBlueBac11に挿入した相補的DNAを作製した。

1. 2. ハイブリドーマの獲得及びスクリーニング

上記3種のp53突然変異タンパク質の等モル混合物でマウスを免疫し、HarlowとLane (Harlow & Lane: Antibodies, a laboratory manual, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory)により記載されている操作プロトコールに従ってハイブリドーマを獲得した。上記p53の突然変異タンパク質に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選択は、HarlowとLane (Harlow & Lane: Antibodies, a laboratory manual, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory)により記載されている操作プロトコールに従い、上記3種のp53突然変異タンパク

質の等モル混合物1μg量を96穴PVCプレートのウェルに予め固定化しており、このウェルでハイブリドーマを培養して産生される抗体を捕獲する方法により実施した。この一次スクリーニングで陽性ハイブリドーマ317個を選択することができた。ハイブリドーマを2週間増幅後、増幅したハイブリドーマの上清をまず上記抗体捕獲法(方法1)により再評価した後、固定化するタンパク質の種類を変え、精製野生型p53タンパク質(方法2)、野生型p53のフラグメント1～320を生産するSf9細胞タンパク抽出物(方法3)、野生型p53のフラグメント73～393を生産するSf9細胞タンパク抽出物(方法4)を

ウェルに固定化する以外は原則として上記と同一の3種のスクリーニング方法を使用することにより分類した。タンパク抽出物はSf9細胞をリン酸緩衝液で凍結／融解により溶解後、細胞破片を超遠心することにより得た。317個の増幅ハイブリドーマ上清のうち、162個は方法1で陰性であった。残りの155個は全て方法2で陽性であり、そのうち33個（グループA）は方法3及び4で陰性であり、115個（グループB）は方法3で陽性且つ方法4で陰性であり、最後の7個（グループC）はどちらの方法でも陽性であった。グループ

Bの上清はp53の最初から73個のアミノ酸に位置するエピトープをもつ抗体を含む上清に対応する。このグループの77個の上清はp53の最初から40個のアミノ酸の配列に対応するペプチド（1mg/ml）とプレインキュベートすると、方法2で陰性であった。グループAの抗体と、上記77個の排除後に残存するグループBの38個の抗体と、グループCの抗体をイソタイプで分類すると、IgMを排除することができた。これらの結果を図1に要約する。

次にp53/DNA複合体にスーパーシフトを誘導する能力を42個の抗体で試験した。プロテインA/Sephadexで精製後、抗体を定量した。p53の特異的固定配列を示す32P標識DNAプローブと共に精製野生型p53タンパク質30ngをインキュベートすることにより、ゲル遅延実験を実施した。次に各抗体300ngを加えた。複合体をアクリルアミドゲル上で分離させた。

図2の結果から明らかなように、これらの抗体のうちの27個はスーパーシフトを誘導することができた。同一ゲル遅延実験で野生型p53タンパク質を突然変異体His273に置き換えることにより、これらの27個のうちの19個を試験した

（図3）。これらの19個の抗体は全て陽性の結果を与えた。抗体番号26は特に遅延が顕著であった。この抗体を11D3と命名し、後続実験で使用した。

実施例2：Scfv421及びD3Mの獲得

VH及びVL領域の特異的縮重プライマーを用いてPCRに基づく慣用分子生物学技術により、ハイブリドーマからScfvを獲得した。抗体11D3に由来

するS c F vをD M 3と命名した。その配列を配列番号2に示す。S c F v 4 2

1の配列は配列番号1に示す。

実施例3：S c F vの発現ベクターの構築

本実施例は本発明の核酸のin vitro又はin vivo導入に使用可能なベクターの構築に関する。

3. 1. プラスミドベクターの構築

プラスミドベクターを構築するために、2種のベクターを使用した。

-DNA Cloning, A practical approach Vol. 2, D. M. Glover (編) IRL Press, Oxford, Washington DC, 1985に記載されているベクターp SV2。このベクターは

真核発現ベクターである。S c F vをコードする核酸をこのベクターにHpa I -Eco RVフラグメントとして挿入した。即ちSV40ウイルスのエンハンサーのプロモーターの制御下において。実施例2に記載した全構築物をこのベクターに導入し、種々のin vitro及びin vivo評価系で試験した。

-ベクターpCDNA3 (Invitrogen)。これも同様に真核発現ベクターである。本発明のS c F vをコードする核酸をCMVの初期プロモーターの制御下にこのベクターに挿入した。実施例2に記載した全構築物をHind I /Not I フラグメントとしてこのベクターに導入した。

3. 2. ウイルスベクターの構築

特定態様によると、本発明は上記核酸のin vivo導入及び発現を可能にするウイルスベクターの構築及び使用にある。

特にアデノウイルスについては、構造と性質が少しずつ異なる種々の血清型が特性決定されている。これらの血清型のうち、本発明の範囲では2もしくは5型ヒトアデノウイルス (Ad 2又はAd 5) 又は動物起源のアデノウイルス (WO 94/26914参照) を使用するのが好ましい。本発明の範囲で使用可能な動物起源のアデノウイルスとしては、イヌ、ウシ、マウス (例えばMav 1

, Beardら, *Virology* 75 (1990) 81)、ヤギ、ブタ、トリ又はサル(例えばSAV)起源のアデノウイルスを挙げることができる。好ましくは、動物起源のアデノウイルスはイヌアデノウイルス、より好ましくはアデノウイルスCAV2 [例えばマンハッタン株又はA26/61 (ATCC VR-800)]である。本発明の範囲ではヒトもしくはイヌ起源のアデノウイルス又は混合アデノウイルスを使用することが好ましい。

好ましくは、本発明の欠損アデノウイルスはITRとパッケージングを可能にする配列と本発明の目的核酸を含む。更に好ましくは、本発明のアデノウイルスのゲノムにおいて、少なくともE1領域は非機能的である。該当ウイルス遺伝子は当業者に公知の任意の方法、特に完全抑圧、置換、部分欠失、又は該当遺伝子に1個以上の塩基を付加することにより非機能的にすることができる。このような改変は、例えば遺伝子工学技術又は突然変異誘発物質で処理することにより *in vitro* (単離したDNAで) 又は *in situ* で得られる。特にE3 (WO95/02697)、E2 (WO94/28938)、

E4 (WO94/28152、WO94/12649、WO95/02697、WO96/22378) 及びL5 (WO95/02697) 領域等の他の領域も改変してもよい。好適実施態様によると、本発明によるアデノウイルスはE1及びE4領域に欠失を含む。別の好適実施態様によると、E1領域に欠失を含み、このレベルにE4領域と核酸を挿入する (WO96/13596)。本発明のウイルスでは、E1領域における欠失はアデノウイルスAd5の配列のヌクレオチド455～3329にわたることが好ましい。

本発明による欠損組換えアデノウイルスは当業者に公知の任意の技術により作製することができる (Levрeroら, *Gene* 101 (1991) 195, EP185573; Graham, *EMBO J.* 3 (1984) 2917)。特に、アデノウイルスと特に目的DNA配列をもつプラスミドの相同組換えにより作製することができる。適当な細胞系で前記アデノウイルス及びプラスミドの同時トランスフェクション後に相同組換えが生じる。使用する細胞系は、(i) 前記要素により形質転換可能であり、(ii) 組換えの危険を避けるために好

ましくは組込み形態で欠損アデノウイルスのゲノムの部分

を相補することが可能な配列を含んでいることが好ましい。細胞系の例としては、特にアデノウイルスAd5のゲノムの左側部分（12%）をそのゲノムに組込んだヒト胎児腎細胞293系（Grahamら, J. Gen. Virol. 36 (1977) 59）や、特にWO94/26914、WO95/02697及びWO96/22378に記載されているようなE1及びE4機能を相補することができる細胞系を挙げることができる。

その後、増殖したアデノウイルスを実施例に記載するように慣用分子生物学技術により回収及び精製する。

アデノ随伴ウイルス（AAV）は、比較的小寸法のDNAをもつウイルスであり、これに感染する細胞のゲノムに安定且つ部位特異的に組込まれる。アデノ随伴ウイルスは細胞増殖、形態又は分化に影響することなく広範な細胞に感染することができる。また、ヒトで疾病に関与しないと思われる。AAVのゲノムは既にクローニングされ、配列及び特性を決定されている。前記ゲノムは約4700塩基を含み、ウイルスの複製起点として機能する約145塩基の逆方向反復領域（ITR）各末端に含む。ゲノムの残余はパッケージング機能をもつ2つの主領域に分けられ、ゲノムの左側部分はウイルス複製とウイルス遺伝

子の発現に関するrep遺伝子を含み、ゲノムの右側部分はウイルスのキャップシドタンパク質をコードするcap遺伝子を含む。

AAVから誘導されるベクターを遺伝子のin vitro及びin vivo導入に利用することは文献に記載されている（特にWO91/18088、WO93/09239、米国特許第4,797,368号、5,139,941号、ヨーロッパ特許第488528号参照）。これらの文献は、AAVから誘導され、rep及び/又はcap遺伝子を欠失し、目的遺伝子で置換された種々の構築物と、前記目的遺伝子を（培養細胞に）in vitro又は（生物に直接）in vivo導入するためのその使用について記載している。本発明による欠損組換えAAVは、ヒト補助ウイルス（例えばアデノウイルス）を感染させた細

胞系に、AAVの2つの逆方向反復領域（LTR）で挟まれた本発明の目的核酸を含むプラスミドと、AAVのパッケージング遺伝子（rep及びcap遺伝子）をもつプラスミドを同時トランسفェクトすることにより作製することができる。使用可能な細胞系は例えば293系である。生成した組換えAAVをその後、慣用技術により精製する。

ヘルペスウイルスとレトロウイルスに関しては、組換えベクターの構築について文献に広く記載されており、特にBreakfield, New Biologיסט3(1991)203;ヨーロッパ特許第453242号及び178220号、Bernsteinら, Genet. Eng. 7(1985)235;McCormick, Biotechnology 3(1985)689等を参照されたい。特に、レトロウイルスは分裂細胞に選択的に感染する組込みウイルスである。従って、癌に適用するのに有利なベクターである。レトロウイルスのゲノムは主に2つのLTRと、パッケージング配列と、3つのコーディング領域（gag、pol及びenv）を含む。レトロウイルスから誘導される組換えベクターでは、一般にgag、pol及びenv遺伝子が完全又は部分的に欠失しており、目的異種核酸配列で置換されている。これらのベクターは種々の型のレトロウイルスから作製することができ、特にMoMuLV（「モロニーマウス白血病ウイルス」、別称MoMLV）、MSV（「モロニーマウス肉腫ウイルス」）、HSV（「ハーベー肉腫ウイルス」）、SNV（「脾壊死ウイルス」）、RSV（「ラウス肉腫ウイルス」）又はフ

レンドウイルス等のレトロウイルスから得られる。

本発明の核酸を含む本発明の組換えレトロウイルスを構築するためには、特にLTRとパッケージング配列と前記核酸を含むプラスミドを構築した後、このプラスミドを使用して、欠損レトロウイルス機能をプラスミドにトランسفードすることができるパッケージング系と呼ばれる細胞系にトランسفェクトする。従つて、一般にパッケージング系はgag、pol及びenv遺伝子を発現させることができる。このようなパッケージング系は従来技術に記載されており、特にP

A 317系(米国特許第4,861,719号)、PsiCRIP系(WO90/02806)及びGP+envAm-12系(WO89/07150)が挙げられる、更に、組換えレトロウイルスは転写活性を抑制するようにLTRのレベルに修飾を含んでいてもよいし、 gag遺伝子の一部を含む拡張パッケージング配列を含んでいてもよい(Bendersら, J. Virol. 61 (1987) 1639)。生成した組換えレトロウイルスをその後、慣用技術により精製する。

本発明を実施するには、欠損組換えアデノウイルス又はレトロウイルスを使用すると特に有利である。これらのベクターは

腫瘍細胞に遺伝子を導入するために特に有利な性質をもつ。

3.3. 化学ベクター

開発されている合成ベクターのうち、本発明の範囲ではポリリジン、(LKLK) n、(LKKL) n(WO95/21931)、ポリエチレンイミン(WO96/02655)及びDEAEデキストラン型のカチオンポリマー、又はカチオン脂質もしくはリポフェクタントを使用すると好ましい。これらのベクターはDNAを圧縮し、細胞膜との結合を助長する性質をもつ。これらのうちでは、リポポリアミン(リポフェクタミン、トランスフェクタム、WO95/18863、WO96/17823)、種々のカチオン又は中性脂質(DOTMA、DOG S、DOP E等)及び核由来ペプチド(WO96/25508)を挙げることができる。更に、レセプターにより媒介されるターゲティングトランスフェクションの概念も開発されており、これは、グラフトしたい細胞型の表面に存在する膜レセプターのリガンドとカチオンポリマーの化学結合により錯体の膜固定を導きながら、カチオンポリマーによりDOP Eを圧縮する原理を利用するものである。例えば、トランスフェリンレセプター、インスリンレセプター又は肝細胞のアシアログリコプロテ

インのレセプターのターゲティングが報告されている。このような化学ベクターを使用する本発明の組成物の製造は、一般に種々の成分と単に接触させることに

より当業者に公知の任意技術により実施される。

実施例4：p53を認識するScFv

ScFvとp53の結合をELISA試験により確認した。

ScFvを検出できるようにmycタグにScFvを融合した。これらの種々のScFvを発現する細菌ペリプラズムからScFv421、11D3(DM3)及び対照ScFv(抗CD3)を作製した。

精製p53により被覆したELISAプレートをIgG11D3、IgG421、ビオチン化抗p53ポリクローナル血清、ScFv11D3、ScFv421及び抗CD3ScFvの種々の希釈液と共にインキュベートした。

次いでアルカリホスファターゼに結合した抗IgG二次抗体により2種のIgGを検出した。ビオチン化血清はアルカリホスファターゼに結合したエキストラビジンにより検出した。ScFvは抗myc9E10抗体により検出後、アルカリホスファターゼに結合した抗IgG抗体により検出した。アルカリホ

スファターゼ活性の比色分析を示す図4から明らかなように、2種の精製IgG、ポリクローナル血清並びにScFv421及び11D3はp53を認識するが、抗CD3ScFvは不活性である。

実施例5：ScFvは野生型p53にスーパーシフトを誘導することができる。

ScFvが野生型p53のDNA結合機能を活性化する能力をゲル遅延実験により試験した。

p53の特異的固定部位を示すDNAデュプレクスを32Pで標識後、精製野生型p53及び種々の精製抗体又は細菌ペリプラズムで生産されたScFvと共にインキュベートした。複合体をアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。得られた結果を図5に示す。

DNA/p53複合体は「基線」に観察された。抗体HR231、pAb421及び11D3は付加遅延(スーパーシフト)を誘導し、DNA/pAb421複合体の量を増加することが可能である。

ScFv421及びDM3もスーパーシフトを誘導できるが、抗ras対照ScFv(YS8)は不活性である。ScFv

421はS c F v DM3と異なり、p 53/DNA複合体の量の増加を誘導しない。

実施例6：S c F vはp 53の突然変異体にDNA結合機能を復元することができる。

同様に、S c F vが不活性突然変異体T r p 248のDNA結合機能を復元する能力を試験した。得られた結果を図6に示す。

2種のS c F vはp 53/DNA複合体に対応する遅延バンドの出現を誘導することが明らかである。

実施例7：S c F vは腫瘍細胞で適正に発現される。

腫瘍細胞H 1299における発現ベクター（SV40のプロモーター）の一過性トランスフェクションによりS c F vの発現を確認した。より詳細には、カチオン脂質リポフェクタミンの存在下に核酸をp SV2型プラスミドベクター（実施例3）の形態で投与した。

得られた結果を図7に示す。完全抽出物のウェスタンプロットによると、予想寸法に対応する約30kDで移動する最大バンドが観察され、分子は腫瘍細胞で有意レベルで発現されることが確認された。

実施例8：S c F vは突然変異体H i s 273のトランス活性化機能を部分的に復元することができる。

これらのS c F vが腫瘍細胞中でp 53の突然変異形態に欠損しているトランス活性化機能に及ぼす作用を次のように測定した。

（いずれもp 53を欠失している）H 358もしくはH 1299系又は（突然変異体p 53 H i s 273を含む）H T 29系で一過性トランスフェクションを実施した。これらのトランスフェクションでは、p 53依存性プロモーターの制御下に野生型p 53又は突然変異体H 273もしくはH i s 175と2種のS c F vの発現ベクターと、CAT（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ）遺伝子を含むレポータープラスミドを導入した。トランスフェクションから48時間後に測定したCAT活性はp 53のトランス活性化機能を表す。

図8の結果から明らかなように、2種のS c F vはH 358系で突然変異体H

His 273 の転写活性を有意に再活性化することができ、*H1299* 系でも同一の結果が得られた。

更に、2種の *ScFv* は *HT29* 系でも内因性突然変異体 *His 273* の転写活性を増加することができる（図9）。

配列

配列番号1 : 421の塩基及びペプチド配列

1/1 31/11
 CAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GGG GCA GAG CTT GTG AGG TCA GGG GCC TCA GTC AAG TTG
 gln val gln leu gln gln ser gly ala glu leu val arg ser gly ala ser val lys leu
 61/21 91/31
 TCC TGC ACA GCT TCT GGC TTC AAC ATT AAA GAC TAC TAT ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG
 ser cys thr ala ser gly phe asn ile lys asp tyr tyr met his trp val lys gln arg
 121/41 151/51
 CCT GAA CAG GGC CTG GAG TGG ATT GGA TGG ATT GAT CCT GAG AAT GGT GAT ACT GAA TAT
 pro glu gln gly leu glu trp ile gly trp ile asp pro glu asn gly asp thr glu tyr
 181/61 211/71
 CCC CCG AAG TTC CAG GGC AAG GCC ACT ATG ACT GCA GAC ACA TCC TCC AAT ACA GCC TAC
 ala pro lys phe gln gly lys ala thr met thr ala asp thr ser ser asn thr ala tyr
 241/81 271/91
 CTG CAG CTC AGC AGC CTG GCA TCT GAG GAC ACT GCC GTC TAT TAT TGT AAT TTT TAC GGG
 leu gln leu ser ser leu ala ser glu asp thr ala val tyr tyr cys asn phe tyr gly
 301/101 331/111
 GAT GCT TTG GAC TAT TGG GCC CAA CGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT
 asp ala leu asp tyr trp gly gln gly thr thr val thr val ser ser gly gly gly
 361/121 391/131
 TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAT GTT TTG ATG ACC CAA ACT CCA CTC
 ser gly gly gly ser gly gly ser asp val leu met thr gln thr pro leu
 421/141 451/151
 ACT TTG TCG GTT ACC ATT GGA CAA CCA GCC TCC ATC TCT TGC AAG TCA AGT CAG AGC CTC
 thr leu ser val thr ile gly gln pro ala ser ile ser cys lys ser ser gln ser leu
 481/161 511/171
 TTG GAT AGT GAT GGA AAG ACA TAT TTG AAT TGG TTG TTA CAG AGG CCA GGC CAG TCT CCA
 leu asp ser asp gly lys thr tyr leu asn trp leu leu gln arg pro gly gln ser pro
 541/181 571/191
 AAG CGC CTA ATC TAT CTG GTG TCT AAA CTG GAC TCT GGA GTC CCT GAC AGG TTC ACT GGC
 lys arg leu ile tyr leu val ser lys leu asp ser gly val pro asp arg phe thr gly
 601/201 631/211
 AGT GGA TCA CGG ACA GAT TTC ACA CTG AAA ATC AAC AGA GTG GAG GCT GAG GAT TTG GGA
 ser gly ser gly thr asp phe thr leu lys ile asn arg val glu ala glu asp leu gly
 661/221 691/231
 GTT TAT TAT TGC TGG CAA GGT ACA CAT TCT CCG CTC ACG TTC GGT GCT GGC ACC AAG CTG
 val tyr tyr cys trp gln gly thr his ser pro leu thr phe gly ala gly thr lys leu
 721/241
 GAA ATC AAA
 glu ile lys

1/1 31/11
 CAG GTC AAG CTG CAG GAG TCA GGG GCA CAA CTT GTG AGG TCA GGG CCC TCA GTC AAT TTG
 gln val lys leu gln glu ser gly ala glu leu val arg ser gly ala ser val asn leu
 61/21 91/31
 TCC TGC ACA GCT TCT GGC TTC AAC ATT AAA GAC TAC TAT ATG CAC TGG GTG AAA CAG AGG
 ser cys thr ala ser gly phe asn ile lys asp tyr trp met his trp val lys gln arg
 121/41 151/51
 CCT GAA GAG GGC CTG GAG TGG ATT GGA TAT ATT GAT CCT GAG AGT GGT GAA ACT GAA TAT
 pro glu glu gly leu glu trp ile gly tyr ile asp pro glu ser gly glu thr glu tyr
 181/61 211/71
 GCC CCG AAC TTC CAG GGC AAG GCC ACT GTG ACT GCA GAC ACA TCC TCC AAC ACA GCC TAC
 ala pro asp phe gln gly lys ala thr val thr ala asp thr ser ser asn thr ala tyr
 241/81 271/91
 CTG CAC CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC ACA ACC GTC TAT TAC TGT AAT GCA GTC ATC
 leu his leu ser ser leu thr ser glu asp thr thr val tyr tyr cys asn ala val ile
 301/101 331/111
 TAC TAT GAA TAC GAC GGC TAT GCT TTG GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC
tyr tyr glu tyr asp glu tyr ala leu asp tyr trp gly gln gly thr thr val thr val
 361/121 391/131
 TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GCC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATT GAG
 ser ser gly gly gly ser gly gly gly ser gly gly gly ser asp ile glu
 421/141 451/151
 CTC ACC CAG TCT CCA TCT TCC CTG GCT GTG TCA GCA GGA GAG AAG GTC GCT ATG AGC TGC
 leu thr gln ser pro ser ser leu ala val ser ala gly glu lys val ala met ser ser cys
 481/161 511/171
 AAA TCC ACT CAC ACT CTG TTC AAC AGT AGA ACC CGA AAG AAT TAC TTG GCT TGG TAT CAG
lys ser ser gln ser leu phe asn ser arg thr arg lys asn tyr leu ala trp tyr gln
 541/181 571/191
 CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT AAA GTG CTG ATC TAC TGG GCA TCC ACT AGG GAA TCT GGA
 gln lys pro gly gln ser pro lys val leu ile tyr trp ala ser thr arg glu ser gly
 601/201 631/211
 GTC CCT GAT CCC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT
 val pro asp arg phe thr gly ser gly ser gly thr asp phe thr leu thr ile ser ser
 661/221 691/231
 GTG CAG GCT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGC AAG CAA TCT TAT AAT CTA CCG ACC TTC
 val gln ala glu asp leu ala val tyr tyr cys lys gln ser tyr asn leu pro thr phe
 721/241
 GGC GGG GCC ACC AAG CTG GAA ATC AAA
 gly gly gly thr lys leu glu ile lys

【図1】

二 次 ス ク リ 一 ニ ン グ

→ N末端／中心／C末端マッピング

ELISA 1-320 / 73-320

| WT | - | + | + | + |
|--------|-----|-----|-----|----|
| 1-320 | - | - | + | + |
| 73-320 | - | - | - | + |
| | 欠失 | C末端 | N末端 | 中心 |
| | 162 | 33 | 115 | 7 |

→ N末端抗体の選択

ELISA WT + ペプチド 1～40 / 34～73 による置換

77抗体が1～40で置換

27抗体が34～73で置換

11抗体が非置換

→ IgMの排除

イソタイプ分類

【図2】

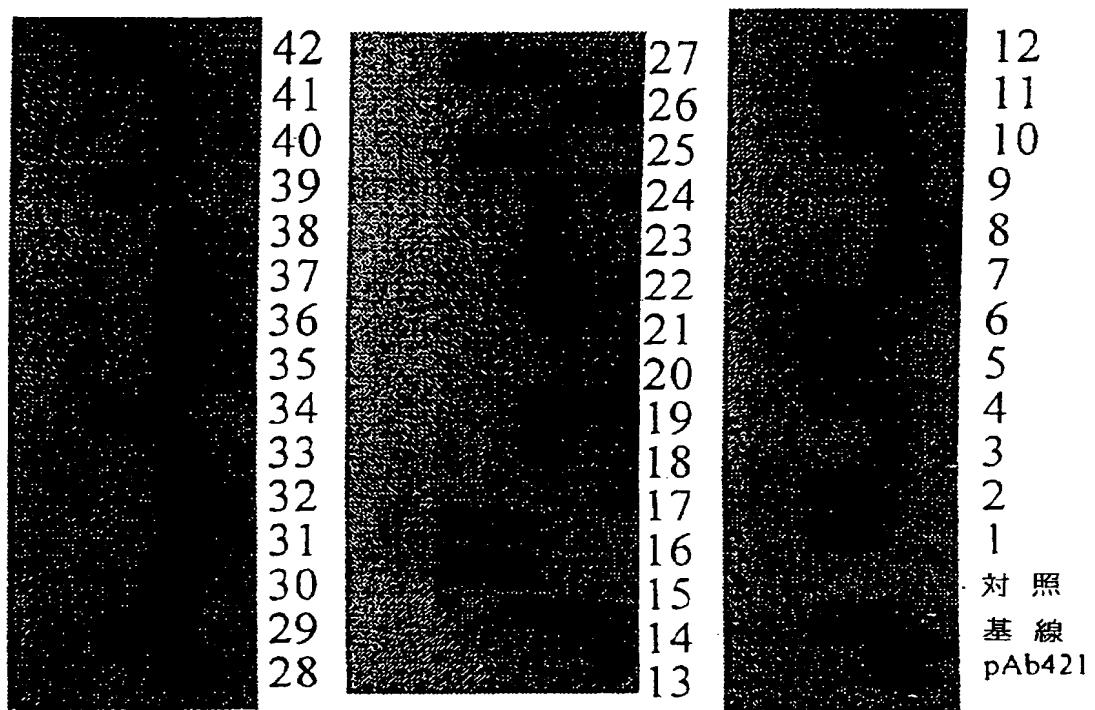


Figure 2

【図3】

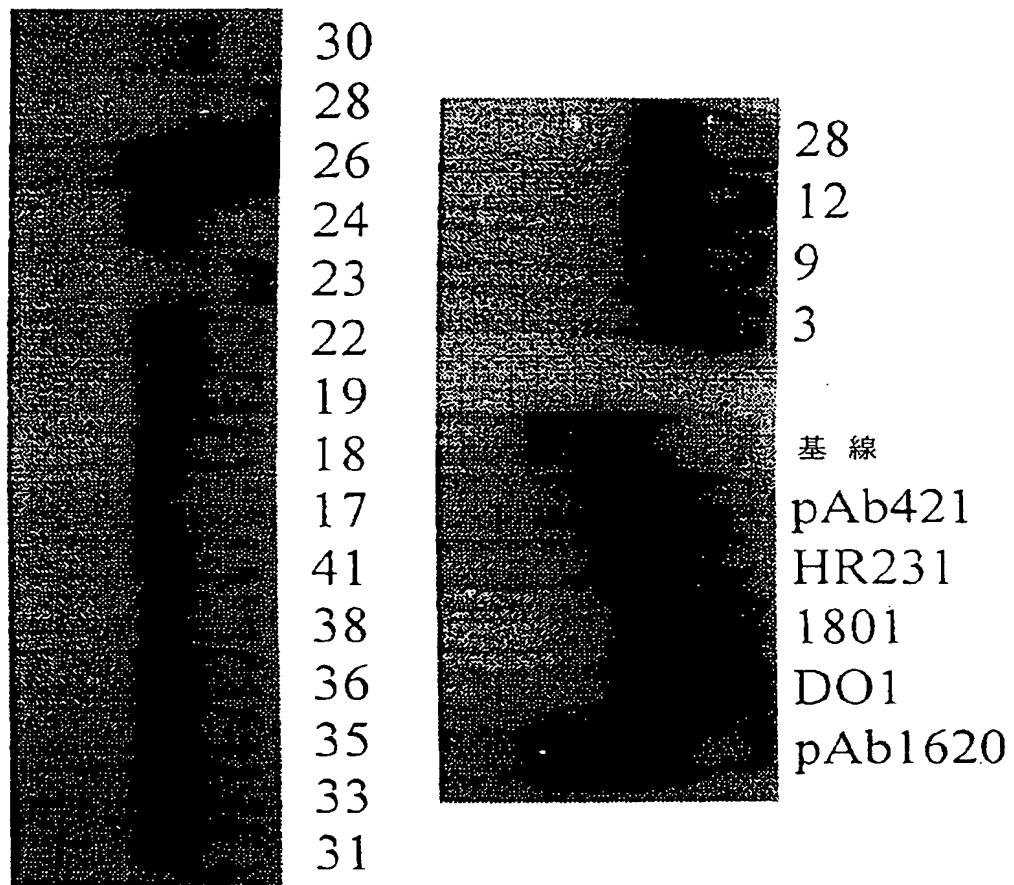


Figure 3

【図4】

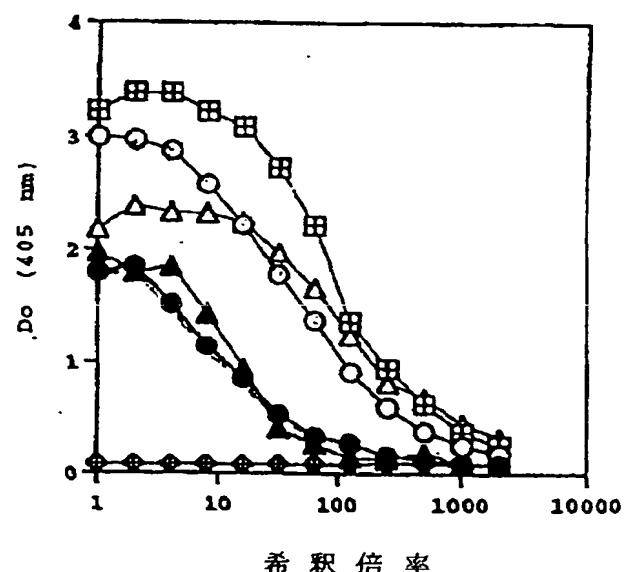
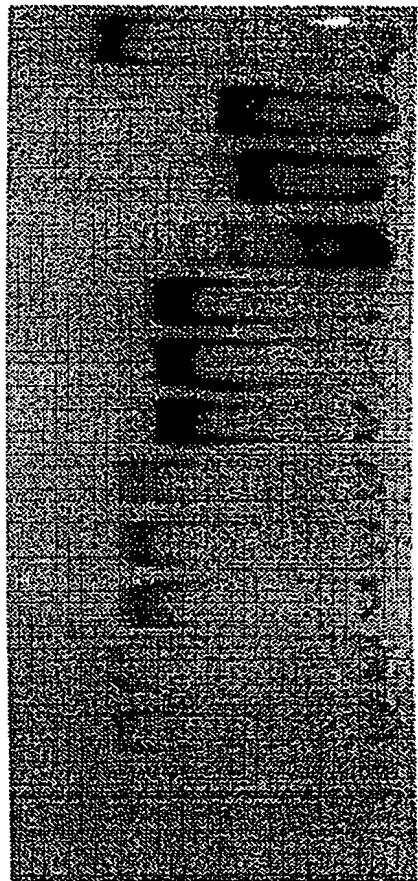


Figure 4

【図5】



基 線

- + HR231
- + pAb421
- + 11D3
- + ScFv421 (2)
- + ScFv421 (5)
- + ScFv421 (10)
- + ScFvD3M (2)
- + ScFvD3M (5)
- + ScFvD3M (10)
- + ScFvY28 (2)
- + ScFvY28 (5)
- + ScFvY28 (10)

Figure 5

【図6】

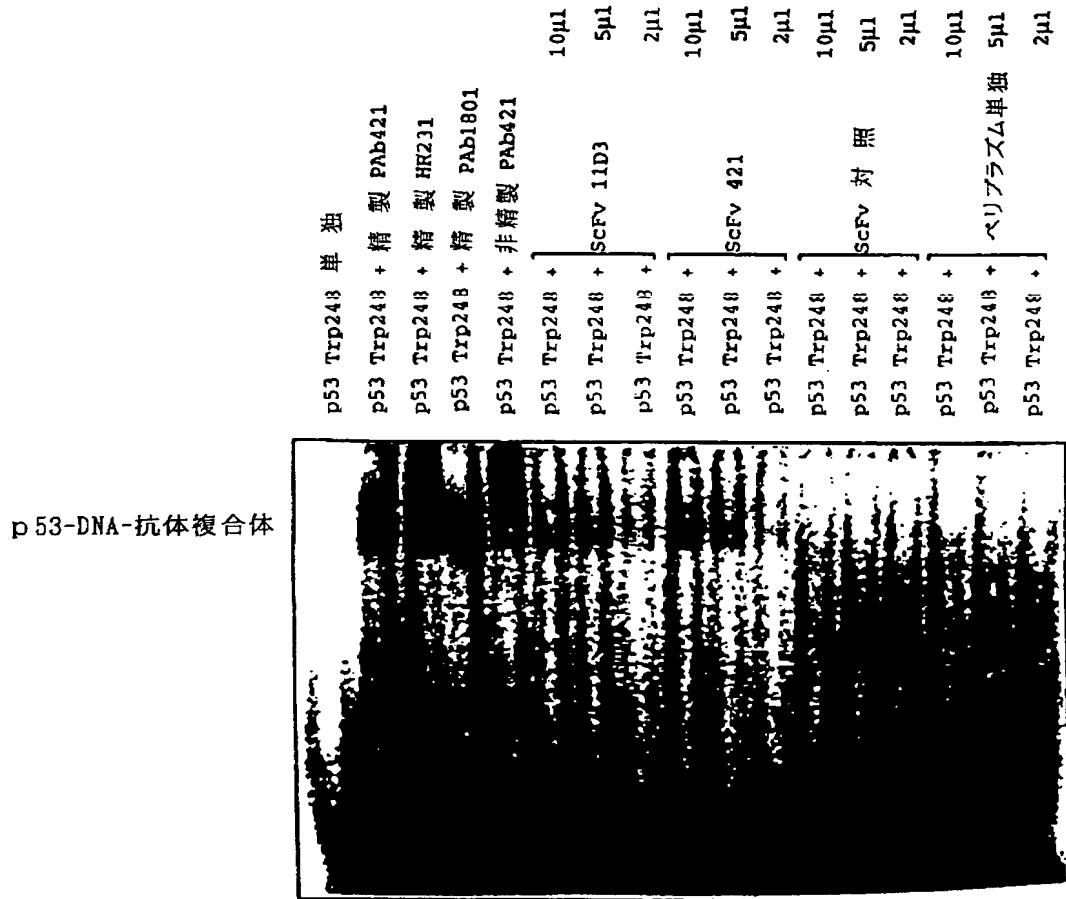


Figure 6

[図7]

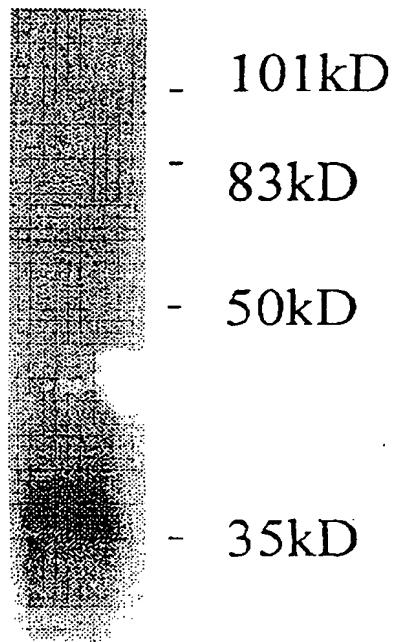


Figure 7

【図8】

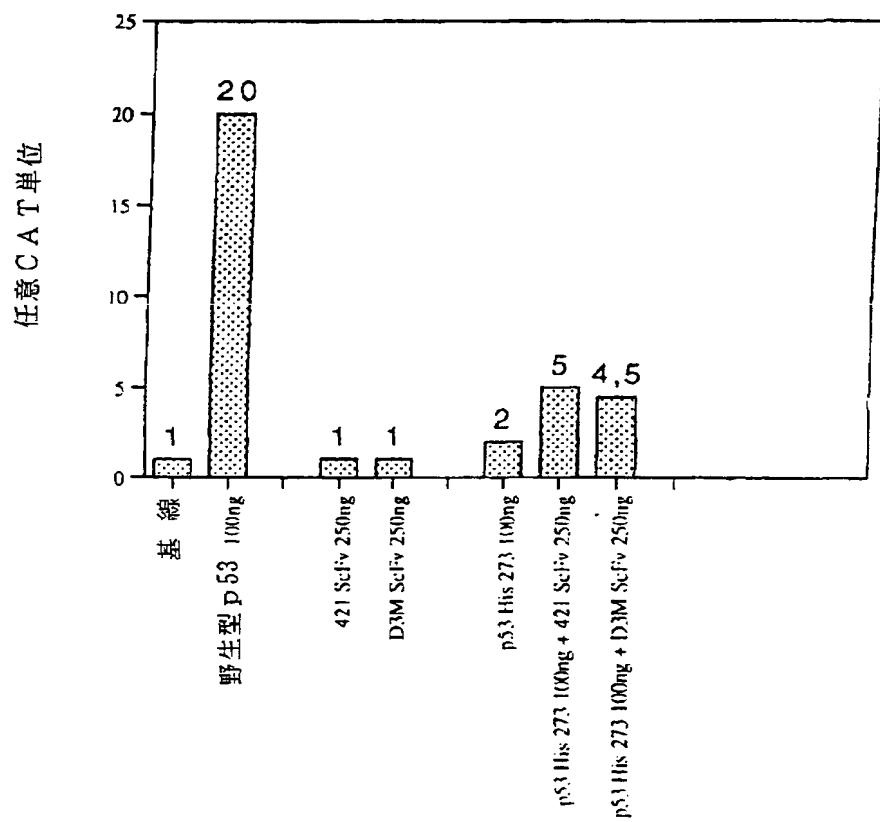


Figure 8

[図9]

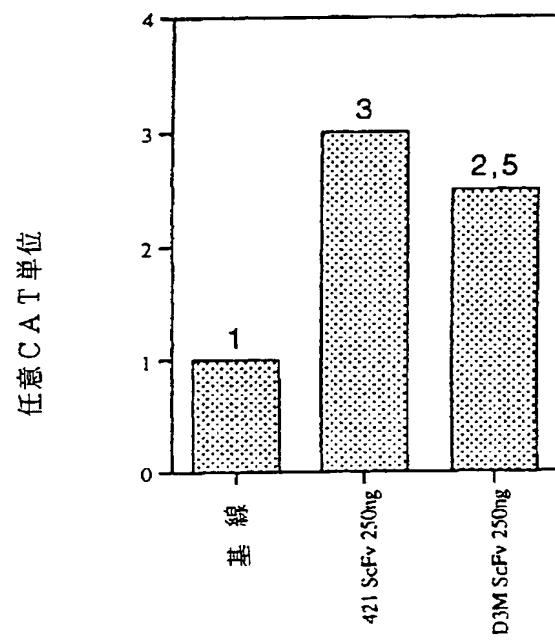


Figure 9

[国際調査報告]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|-----------------------------|
| Int'l Search Application No |
| PCT/FR 97/01921 |

| | | |
|--|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| IPC 6 C07K16/18 C12N15/13 A61K39/395 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) | | |
| IPC 6 C07K C12N A61K | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category ^a | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 96 30512 A (RHONE POULENC RORER SA ;BRACCO LAURENT (FR); SCHWEIGHOFFER FABIEN) 3 October 1996 cited in the application see the whole document --- | 1-27 |
| X | ABARZUA P. ET AL.: "Microinjection of monoclonal antibody Pab421 into human sw480 colorectal carcinoma cells restores the transcription activation function to mutant p53" CANCER RESERACH, vol. 55, - 15 August 1995 pages 3490-3494, XP002035503 see the whole document --- | 1,18,19 |
| | | -/- |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. | | <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. |
| * Special categories of cited documents : | | |
| *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | | |
| *E* earlier document but published on or after the international filing date | | |
| *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified) | | |
| *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | | |
| *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | |
| *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention | | |
| *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone | | |
| *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art | | |
| *Z* document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search | | Date of mailing of the international search report |
| 12 February 1998 | | 04.03.98 |
| Name and mailing address of the ISA | | Authorized officer |
| European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3016 | | Müller, F |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.
PCT/FR 97/01921

| C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|--|-----------------------|
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | HUPP T R ET AL: "REGULATION OF THE SPECIFIC DNA BINDING FUNCTION OF P53" CELL, vol. 71, 27 November 1992, pages 875-886, XP000619238 see whole document esp. p.876, 3.par.ff | 1-27 |
| A | HALAZONETIS T D ET AL: "WILD-TYPE P53 ADOPTS A "MUTANT"-LIKE CONFORMATION WHEN BOUND TO DNA" EMBO JOURNAL, vol. 12, no. 3, 1993, pages 1021-1028, XP000619249 see page 1023, column 2, paragraph 2 | 1-27 |
| A | WO 94 12202 A (UNIV DUNDEE ;LANE DAVID PHILIP (GB); HUPP THEODORE ROBERT (GB)) 9 June 1994 see the whole document | 1-27 |
| P,X | JANNOT C.B. & HYNES N.E.: "Characterization of scFv-421, a single-chain antibody targeted to p53" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 230, - 13 January 1997 pages 242-246, XP002035502 see the whole document | 1-14, 16-20 |
| P,X | WO 97 04092 A (RHONE POULENC RORER SA ;CONSEILLER ENNANUEL (FR); BRACCO LAURENT () 6 February 1997 see the whole document, esp. p.14, line 6 ff. and p.34 line9 ff. | 1-14, 18-20 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 97/01921

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **1-18**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 1-18 (as far as in vivo method is concerned) are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 97/01921

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|---|--|
| WO 9630512 A | 03-10-96 | FR 2732348 A AU 5402096 A CA 2214451 A EP 0817845 A NO 974449 A | 04-10-96 16-10-96 03-10-96 14-01-98 26-09-97 |
| WO 9412202 A | 09-06-94 | AU 680216 B AU 5533194 A CA 2150265 A EP 0675729 A JP 8505607 T | 24-07-97 22-06-94 09-06-94 11-10-95 18-06-96 |
| WO 9704092 A | 06-02-97 | FR 2736915 A AU 6618696 A | 24-01-97 18-02-97 |

フロントページの続き

| (51)Int.C1. ⁷ | 識別記号 | F I | テ-マコード (参考) |
|--------------------------|--|---------------|-------------|
| C 0 7 K 16/18 | | C 0 7 K 16/18 | |
| // C 1 2 P 21/08 | | C 1 2 P 21/08 | |
| (81)指定国 | E P(A T, B E, C H, D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), O A(B F, B J, C F , C G, C I, C M, G A, G N, M L, M R, N E, S N, T D, T G), A P(G H, K E, L S, M W, S D, S Z, U G, Z W), E A(A M, A Z, B Y, K G , K Z, M D, R U, T J, T M), A L, A U, B A , B B, B G, B R, C A, C N, C U, C Z, E E, G E, G H, H U, I D, I L, I S, J P, K P, K R, L C, L K, L R, L T, L V, M G, M K, M N , M X, N O, N Z, P L, R O, R U, S G, S I, S K, S L, T R, T T, U A, U S, U Z, V N, Y U, Z W | | |



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

| | | | |
|---|--|--|--|
| (51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K 16/18, C12N 15/13, A61K 39/395 | | A1 | (11) Numéro de publication internationale: WO 98/18825 (43) Date de publication internationale: 7 mai 1998 (07.05.98) |
| <p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01921</p> <p>(22) Date de dépôt international: 27 octobre 1997 (27.10.97)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 96/13176 29 octobre 1996 (29.10.96) FR</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): BRACCO, Laurent [FR/FR]; 12, rue Moulin des Près, F-75013 Paris (FR). DEBUSSCHE, Laurent [FR/FR]; 112, avenue Jean Jaurès, F-91200 Athis Mons (FR).</p> <p>(74) Mandataire: SAVINA, Jacques; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).</p> | | <p>(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p> | |

(54) Title: ANTI-P53 SINGLE-CHAIN ANTIBODY FRAGMENTS AND THEIR USES

(54) Titre: FRAGMENTS D'ANTICORPS A CHAINE UNIQUE ANTI-P53 ET UTILISATIONS

(57) Abstract

The invention concerns single-chain antibodies directed against the p53 protein, capable of being expressed in tumoral cells, capable of restoring a DNA binding in vitro and a transcription activator function in vivo. The invention also concerns nucleic acids coding for these molecules, the vectors containing them and their uses.

(57) Abrégé

La présente invention concerne des anticorps à chaîne unique dirigés contre la protéine p53, capables d'être exprimés dans des cellules tumorales, capables de restaurer un fonction DNA binding in vitro et une fonction d'activateur transcriptionnel in vivo. Elle concerne également les acides nucléiques codant pour ces molécules, les vecteurs les contenant et leurs utilisations.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)